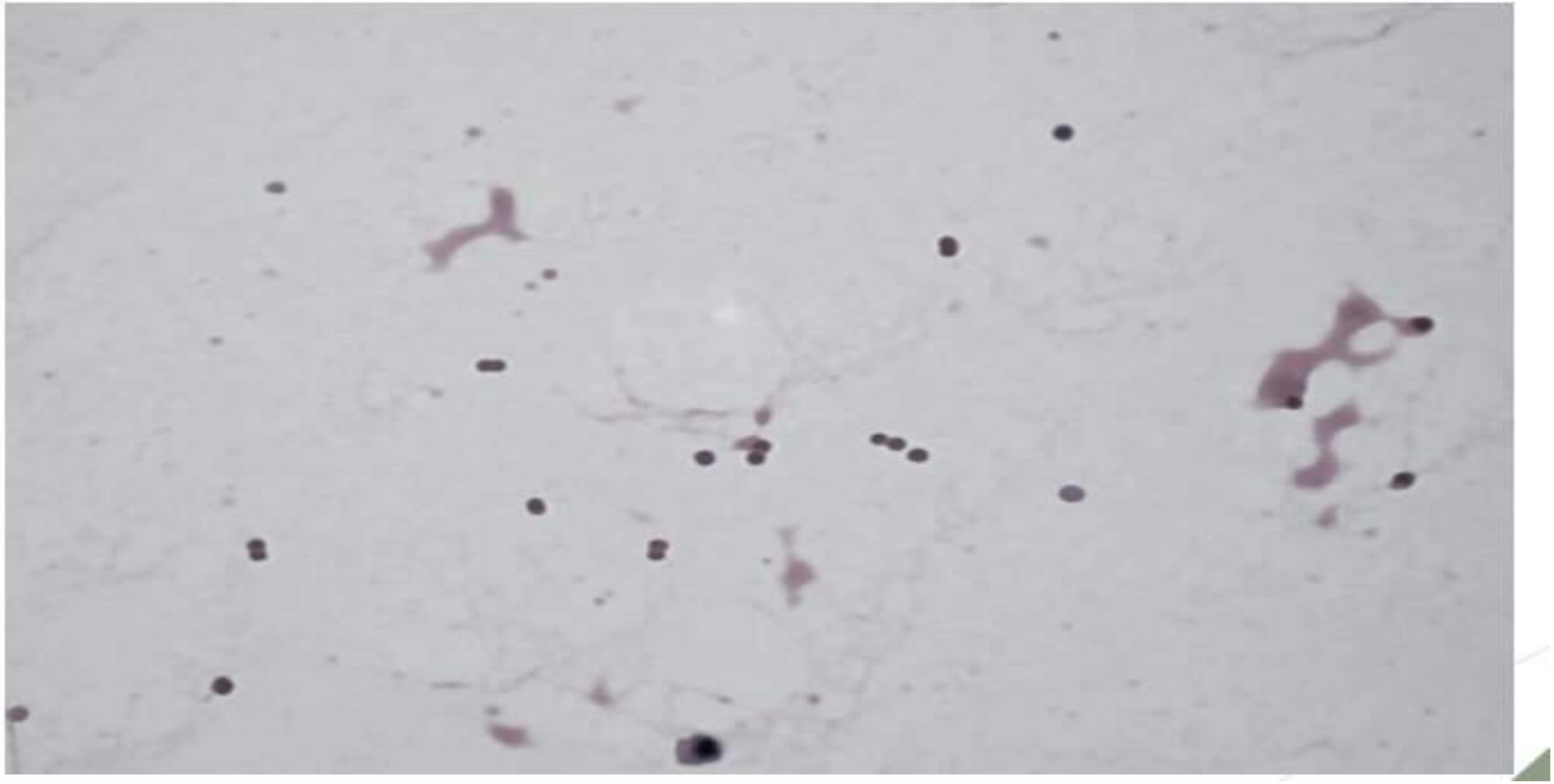
بررسی و تفسیر نتایج باکتری شناسی EQAP-46

دکتر شهروز همتی
دکترای علوم آزمایشگاهی

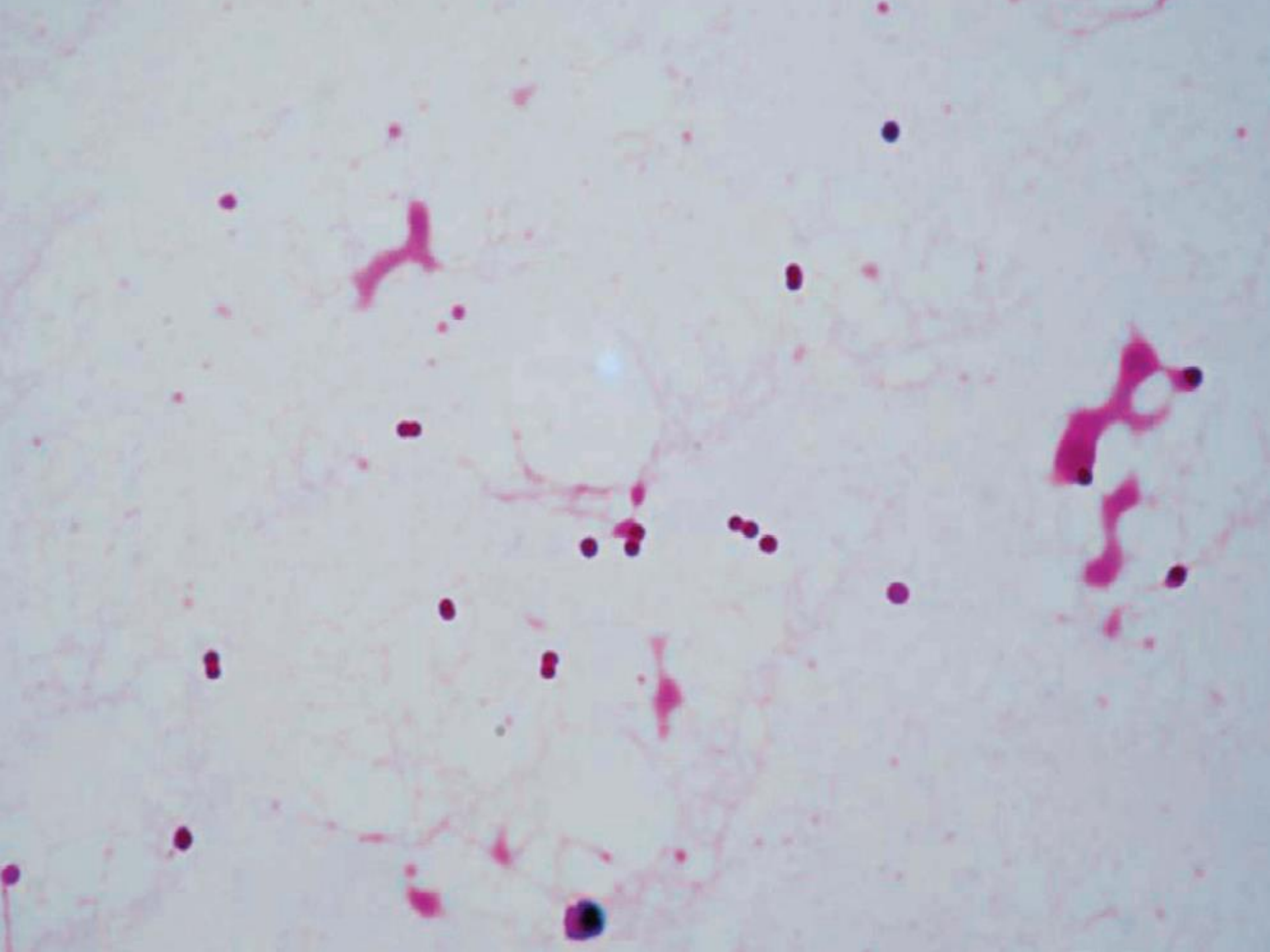
گزارش مورد

خانمی ۸۳ ساله با تاریخچه دیابت و فشار خون توسط خانواده اش به بخش اورژانس آورده شده.
در هنگام ویزیت تب و لرز داشت و کمی گیج به نظر میرسید.فشار خون۱۶۵/۸۵ ضربان ۸۶ و درجه حرارت ۳۹ درجه سانتی گراد.
در معاینه سفتی گردن نداشت.
در بررسی آزمایشگاهی به جز لوکوسیتوز ۱۱۰۰۰ و مثبت بودن سی آر پی یافته خاصی مشاهده نشد.
عکس قفسه سینه نرمال بود و در سی تی اسکن منبعی از عفونت مشاهده نشد.
کشت و کامل ادرار نرمال بود.
مایع مغزی نخاعی از بیمار گرفته شد.
شفاف وبی رنگ
شمارش لکوسیت ها ۲ در میکرولیتر بدون گلبول قرمز
گلوکزخون ۱۵۳ گلوکز مایع نخاعی ۹۳ و پروتئین مایع نخاعی۵۶ میلی گرم در دسی لیتر بود

رنگ آمیزی گرم از مایع نخاعی



کشت مایع مغزی نخاعی



عناوین مورد بحث

- مقدمه
- گزارش آماری نتایج باکتریها
- ملاحظات کلی درشناسایی باکتریها
- نکات کلیدی درتفسیر تستهای بیوشیمیایی

هدف از ارسال نمونه های کنترل کیفی خارجی

- متاسفانه آزمایشگاهها نتایج نمونه های باکتری شناسی را معیاری جهت ارزیابی فرض می کنند و با روشهای مختلف و حتی تبادل نظر ?با همکاران میخواهند به جواب درست برسندوثبت نتایج را تا روزهای پایانی به تاخیر می اندازند گرچه مشاوره امری پسندیده است ولی وجودنمونه های مختلف موجب میشود که این مشاوره ها نتایج عکس در پی داشته باشد.
- ارسال نمونه های خارجی روشی جهت ارزیابی و افزایش توان تشخیصی آزمایشگاههای میکروبشناسی بوده و استفاده ازاین توان درشناسایی طغیان های عفونت های باکتریال در کشور بسیار مهم است.
- آزمایشگاهها بایستی با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج مورد انتظار به بررسی علل اشتباهات تستهای تشخیصی ورفع آن پرداخته تا در دوره بعد و مهمتر از آن در شناسایی عفونت های باکتریال بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه از این نتایج استفاده نمود.
- در نهایت یافتن منابع خطا در محیط ها ی کشت و روشهای تشخیصی وبعضا جداول مورد استفاده موجب ارتقا و بهبود کیفیت روشهای تشخیصی در میکروبشناسی خواهد شد.

- ۱-زمان گزارش
- ارسال نمونه های دوره۴۶ ازاول آذر آغاز شد واز۱۸تا ۳۰آذر سایت جهت جوابدهی باز شد و تا۴ دی ماه تمدید شد.
- نتایج طی دو هفته برروی سایت قرار گرفت.
- ۲-نحوه ثبت گزارش
- الف)بدون تشخیص
- ب) دارای تشخیص
- ج)تشخیص درست با تستهای کلیدی کاملا اشتباه
- د)انتخاب تستها درست ولی تشخیص اشتباه
- ه)تشخیص درست فقط با چند تست ساده
- ۳-نوع باکتریهای ارسالی : در ۱۲ دوره گذشته هر کدام از باکتریهای بیش از یک بار برای همکاران ارسال شده و این نکته را بایستی همکاران توجه کنند و اشتباهات گذشته را تکرا نکنند.
- ۴-با توجه به زمان جوابدهی کشت نمونه ها در آزمایشگاهها که به طور معمول ۲-۳ روز طول می کشد و نمونه های ارسالی کشت خالص باکتریست و احتیاجی به به محیطهای انتخابی افتراقی و محیطهای غنی کننده ندارد این بازه زمانی طولانی جهت ثبت جواب ها قابل توجیه نیست.

Urinary tract infection due to Group B *Streptococcus*: A case series from Eastern India

Srujana Mohanty,[1] Geetarani Purohit,[1] Sutapa Rath,[1] Rajeev Kumar Seth,[1] and Rashmi Ranjan Mohanty[2]

► Author information ► Article notes ► Copyright and License information PMC Disclaimer

Associated Data

► **Data Availability Statement**

Abstract

Go to: ►

Group B *Streptococcus* (GBS) or *Streptococcus agalactiae* is an uncommon causative agent of urinary tract infection (UTI). We present a series of seven cases of UTI due to GBS from a tertiary care hospital of Eastern India, highlighting its emerging role in a hitherto less commonly described entity.

Feedback

Case Report

Int J Med Rev Case Rep. 2020; 4(9): 18-20
doi: 10.5455/IJMRCR.Recurrent-Isolation-Streptococcus-pyogenes

Recurrent Isolation of Streptococcus pyogenes from a Case of Complicated Urinary Tract Infection

Rachana Kannambath, Dhanalakshmi Gounassegarane, Jharna Mandal, Sreejith Parameswaran.

No Audio-Abstract available

Abstract

Cited by 0 Articles

Streptococcus pyogenes is an uncommon pathogen encountered in urinary tract infections.
Using the routine urine culture methods followed in most of the laboratories, fastidious organisms are often missed as a uropathogen. Here we report a case of repeated isolation of Streptococcus pyogenes from urine sample in significant quantity ,from a symptomatic adult man with underlying urological abnormalities. It is emphasised that gram positive organisms especially unusual ones like Streptococcus pyogenes should not be overlooked as a causative agent of urinary tract infection.

Key words: Streptococcus pyogenes, Urinary tract infection, Recurrent infection

Beta haemolytic group A streptococci causing urinary tract infection

T Palocaren et al. Br J Urol. 1994 Oct.

Show details

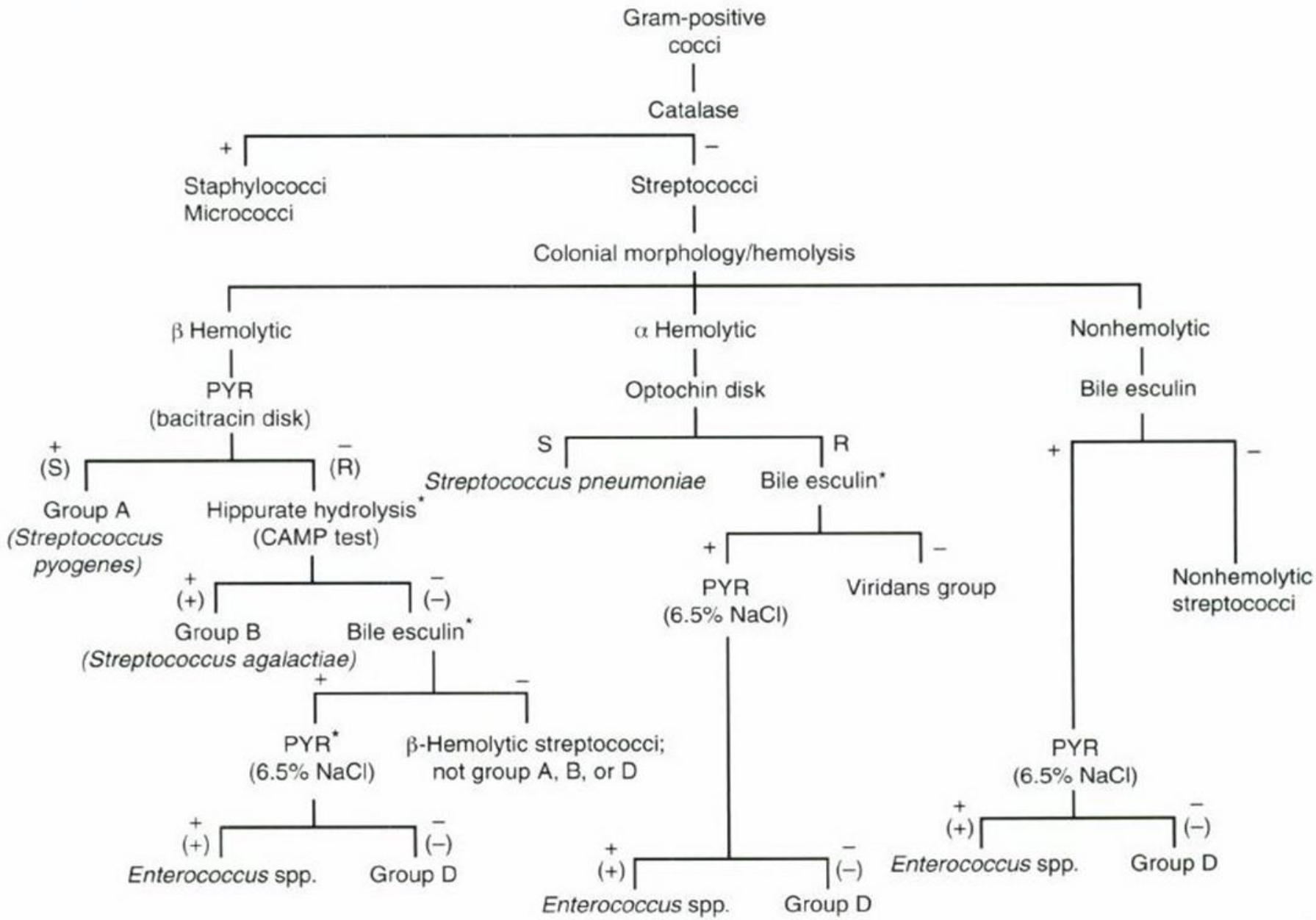
Abstract

Objective: To describe the clinical and laboratory findings in patients with Group A streptococci (GAS) bacteriuria.

Patients: Patients with GAS bacteriuria seen in a tertiary care hospital in southern India between 1988 and 1993 were identified. Data were collected from the hospital records.

Result: GAS were isolated from 15 women and 11 men. Clinical data were available for 24 of these. The condition presented as asymptomatic bacteriuria (nine patients), dysuria or frequency (12), and fever without localizing signs (three). All infections occurred in individuals with systemic or local conditions predisposing to urinary tract infection. All patients responded well to antimicrobial therapy.

چارت شناسائی کوکسی های گرم مثبت کاتالاز منفی



بررسی نتایج باکتری

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	883		تشخیص های درست	354	41.55
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	854	96.72	تشخیص های نیمه درست	416	48.83
جوابهای دارای تشخیص	852	99.77	تشخیص های اشتباه	82	9.62
جوابهای بدون تشخیص	9	1.05			
تشخیص پانل M1-1 زیرگروه یک			**Streptococcus pyogenes**		

در مقایسه نتایج با دوره 35 به نظر می رسد که :

درصد تشخیص های درست از۳۵ به ۴۱/۵ درصد افزایش یافته درصد تشخیص های اشتباه و درصد تشخیص های نیمه درست نیز کاهش یافته اند

Test	46	35
Gam satin	G+cocci ۸۱۵(۹۴/۶%)	92%
Catalase	Neg(87%)	82%
Beta Hemoiytic	Pos (38%)	32%
Bacitracin 0.04 U Susceptibility Test	S (24%)	18%
Bacitracin Susceptibility Test	S (40.12%)	39%
PYR	Pos(6.5%)	5%
Vancomycin Susceptibility Test	S(9.4%)	8%
SXT Susceptibility Test	R(30.31%)	29%

M1-2

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	907		تشخیص های درست	253	30.19
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	853	94.05	تشخیص های نیمه درست	459	59.55
جوابهای دارای تشخیص	838	98.24	تشخیص های اشتباه	86	10.26
جوابهای بدون تشخیص	18	2.11			
تشخیص پانل M1-2 زیرگروه یک			Streptococcus agalactiyeh		

در مقایسه نتایج با دوره 41به نظر می رسد که :

درصد تشخیص های درست از ۳۹/۸درصد به ۳۰/۱۹ دصدکاهش یافته است؟؟؟؟

Test	46	41
Gam satin	G+ cocci 809(94.5%)	G+ cocci 853(92.8%)
Catalase	Neg 756(88.6%)	Neg 754(83.8%)
Beta Hemoiytic	Pos 230(26.8%)	Pos 265(29.48%)
Bacitracin Susceptibility Test	R 298(38.4%)	R 306(34.04%)
Bacitracin 0.04 U Susceptibility Test	R 165(19.2%)	R 169(18.8%)
Bacitracin 10 U Susceptibiliy Test	R 50(5.8%)	R38(4.23%)
PYR Test - Pyrrolidonylarylamidase	Neg 50(5.8%)	Neg 41(4.56%)
CAMP Test	Pos 444(51.8%)	Pos 452(50.2%)
Hippurate hydrolysis Test	Pos 60(7.01%)	Pos 50(5.56%)

M1-3

	تعداد	درصد		تعداد	درصد
نمونه های فرستاده شده	1803		تشخیص های درست	1354	80.6
جوابهای دریافتی(تعداد موارد ثبت شده)	1709	94.79	تشخیص های نیمه درست	227	13.51
جوابهای دارای تشخیص	1680	98.30	تشخیص های اشتباه	99	5.89
جوابهای بدون تشخیص	30	1.76			
تشخیص پانل M1-3 زیرگروه یک			Staphylococcus aureus		

در مقایسه نتایج با دوره 41به نظر می رسد که :

درصد تشخیص های درست از۷۵/۸ درصد به۸۰/۶ افزایش یافته و درصد تشخیص های اشتباه و درصد تشخیص های نیمه درست نیز کاهش یافته است.

Test	46	41
Gam satin	C+Cocci(93.86)	92.7%
Catalase	Pos(90%)	85.9%
Beta Hemoiytic	Pos(14.21%)	11.9%
Coagulase Test / Slide (clumping factor)	Pos(38.54%)	33.9%
Coagulase Test / Tube	Pos(68.01%)	64.3%
DNase (25° / 35° C)	Pos(27.72)	26.7%
MSA	Pos(41.17%)	34.9%

رنگ آمیزی گرم

اصول:
رنگ آمیزی گرم یک روش تشخیصی مهم در میکروبشناسی جهت تشخیص احتمالی و سریع عوامل عفونی است. این آزمایش برای طبقه بندی باکتری ها بر اساس شکل ، اندازه و مورفولوژی سلول بر اساس واکنش گرم آنها به کار میرود
نمونه:
محیط های کشت جامد ، مایع و نمونه های بالینی
نمونه های بالینی تازه باید جوان بوده و کمتر از ۲۴ ساعت عمر داشته باشد.
نمونه برداشت شده از محیطهای غیر انتخابی بهترین نتیجه را میدهد

اساس:
واکنش ترکیبات دیواره سلولی با رنگ های مورد استفاده

رنگ آمیزی گرم

دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت دارای یک لایه ضخیم پپتیدوگلیکان بوده(٪۹۰ دیواره سلولی) در صورتی که دیواره سلولی باکتری های گرم منفی یک لایه نازک پپتیدوگلیکان(حدود ۱۰ درصد)و مقدار زیادی لیپید دارد.

در هنگام رنگ آمیزی ابتدا یون های مثبت کریستال ویوله وارد دیواره سلولی باکتری شده و به ترکیباتی که دارای شارژ منفی هستند متصل میشود

ید که اضافه شدبه همراه ضخامت چند لایه پپتید و گلیکان دیواره سلولی موجب می‌شود که در دیواره سلولی باقی مانده و در اثر رنگ بر شسته نشده و بنابراین ارغوانی باقی می ماند

رنگ برموجب تخریب غشای خارجی باکتری های گرم منفی می شود

در هنگام رنگ آمیزی دیواره چند لایه پپتیدوگلیکان باکتری های گرم مثبت به وسیله الکل دهیدراته شده و این موضوع به همراه ضخامت چند لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولی با مقادیر زیادی کمپلکس در دیواره سلولی باقی مانده و در اثر رنگبری خارج نشود. بنابراین ارغوانی باقی می ماند

رنگ زمینه که اضافه شد(سافرانین وکربول فوشین) باکتری های گرم مثبت ارغوانی و باکتری گرم منفی رنگ زمینه را به خود میگیرد

رنگ آمیزی گرم

تهیه گسترش:گسترش مناسب باید با تراکم مناسب از میکروارگانیسم باشد تا آرایش آنها مشخص شود. از لام های تمیز و نوکه ترجیحابا الکل تمیز شده اند استفاده شود

ثابت کردن گسترش :

حرارت:ابتدا اجازه می دهید تا گسترش در مجاورت هوا خشک شود(در محیط آزمایشگاه یا انکوباتور)لام را از روی شعله عبور دهید.حرارت دادن زیادموجب سوختگی و تغییر شکل سلول‌ها می‌شود.

متانول:بعد از خشک شدن لام چندقطره متانول راروی گسترش ریخته و اجازه میدهیم یک دقیقه بماندو خشک شود

بهترین روش ثابت کردن لام خصوصاً در نمونه های بالینی استفاده ازمتانول است زیرا موجب حفظ مورفولوژی باکتریها و گلبولهای سفید و قرمزمیشود

به علت عدم لیز شدن گلبول های قرمززمینه لام واضح تر می گردد.

رنگ آمیزی گرم

- توصیه ها:
- تطابق نتایج رنگ آمیزی گرم با سایر یافته های آزمایشگاهی
- پیروی دقیق از دستورالعمل های رنگ آمیزی جهت کسب نتایج صحیح

- مشاهده میکروارگانیسم در صورت منفی بودن کشت :
- حضور عوامل ضد میکروبی
- باکتری هایی که در شرایط معمول رشد نمی کنند
- آلودگی معرف ها و لوازم

- نتایج نادرست ممکن است ناشی از نامناسب بودن کیفیت نمونه ها باشد
- نتایج واکنش گرم در نمونه های تازه ممکن است با نمونه های کهنه کاملا متفاوت باشد.
- انجام آزمایش بر روی نمونه های تازه(۱۸ تا ۲۴ ساعته) زمانی که باکتری ها در فاز لگاریتمی رشد بوده و مورفولوژی و سایر خصوصیات آنها در بهترین شرایط می باشد.
- رنگ ها، آب یا رنگ برها را مستقیماً روی اسمیر نریزید. قطره های معرف را نزدیک انتهای لام ریخته و اجازه دهید معرف روی سطح اسمیر را بپوشاند

رنگ آمیزی گرم

- عوامل رایجی که موجب رنگ آمیزی نامناسب می شوند
- لام های شیشه ای چرب و کثیف(اتانول ٪۹۵)
- گسترش خیلی ضخیم
- حرارت دادن زیاد هنگام فیکساسیون لام
- آبکشی زیاد در حین شستشو
- رنگبری زیاد

رنگ آمیزی گرم

- روش هوکراستفاده از سافرانین
- روش کوپلوف استفاده از کربول فوشین :
- این روش برای مشاهده و افتراق بهتر باکتری های بی هوازی، کمپیلوباکتر، پیشنهاد می شود که ممکن است با روش هوکر به آسانی و خیلی زیاد تحت تأثیر رنگ بر، رنگ خود را از دست داده و کمرنگ رنگ بگیرند. این روش همچنین برای اسمیرهای واژن در تشخیص واژینوزیس باکتریایی پیشنهاد می شود
- نتایج مورد انتظار
- باسیل های گرم منفی صورتی
- باکتری های گرم مثبت بنفش
- کنتر کیفی
- Escherichia coli (ATCC 25922) صورتی
- Staphylococcus aureus(ATCC 25923) بنفش پررنگ

رنگ آمیزی گرم

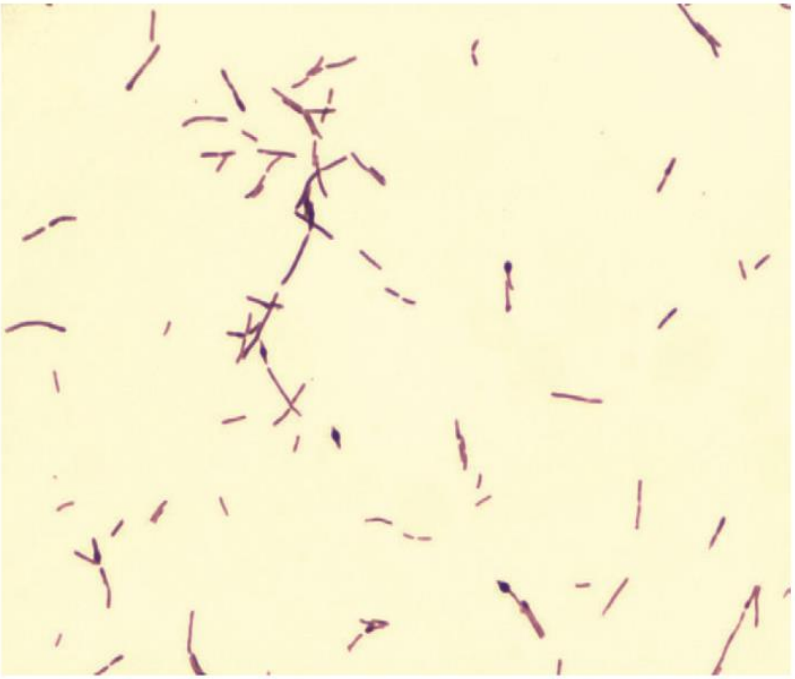


Figure 22-2 Gram stain of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in culture. Note the variable lengths of the rods and the "gram-negative" appearance.

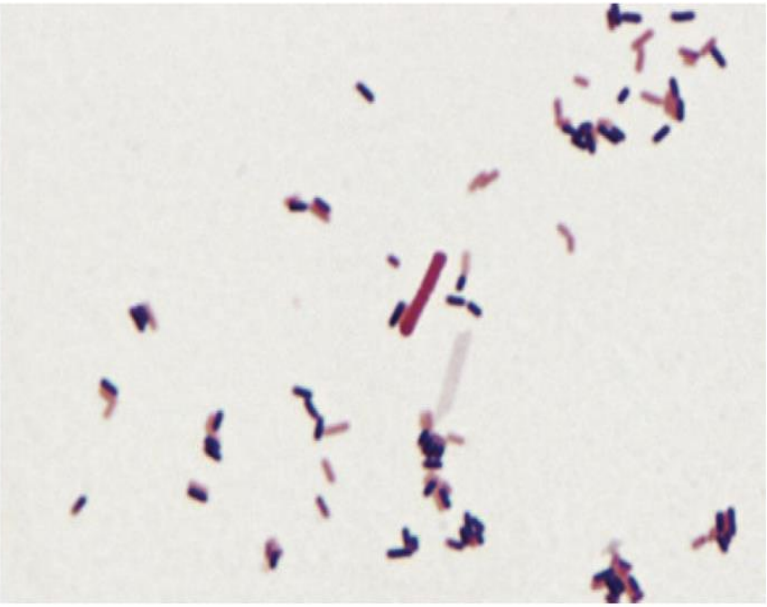


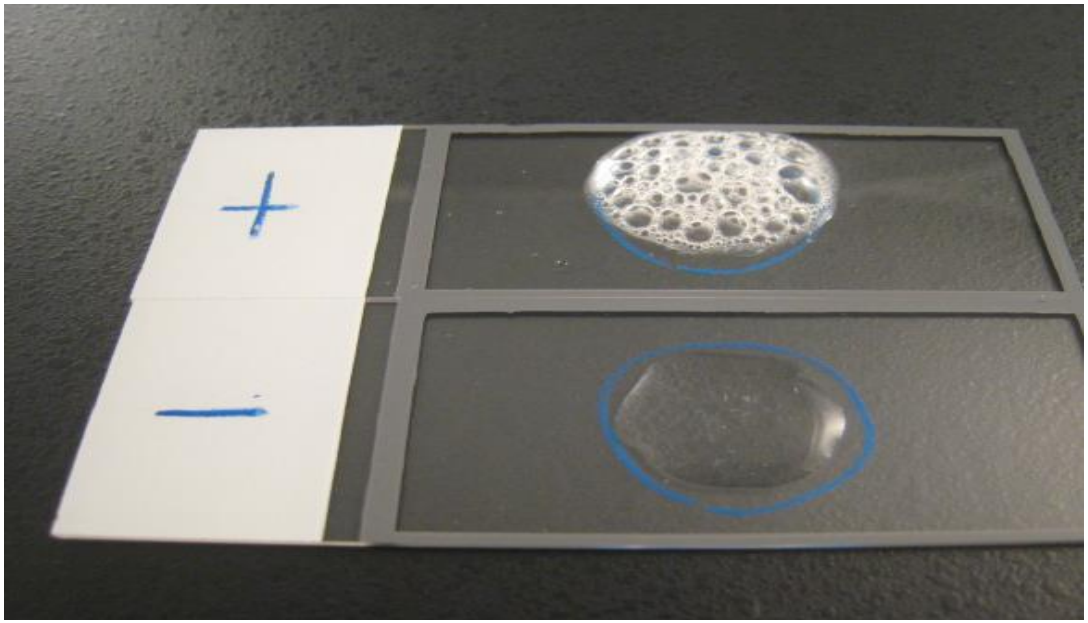
Figure 22-1 Gram stain of *Listeria monocytogenes* in culture. *Listeria* appear as small gram-positive rods; some readily decolorize and appear gram-negative. The much larger gram-negative rod in the center of the photograph is *Escherichia coli*.

کاتالاز

- تاریخچه: باکتریها برای بقا خود احتیاج به یک سیستم دفاعی برای فرار از تاثیر مخرب H2O2 دارند. برخی از باکتری ها دارای کاتالاز هستند که باکتری را از تاثیر مخرب و کشنده پراکسید هیدروژن محافظت می کند. آزمایش کاتالاز یکی است روش های مهم تشخیصی در شناسایی باکتری ها می باشد. در Got۱۸۹۳ به اهمیت وجود کاتالاز در باکتریها پی برد
- هدف: شناسایی باکتری های کاتالاز مثبت(میکروکوکاسیه) از کاتالاز منفی(استرپتوکوکاسیه).
- اساس: کاتالاز آنزیمی است که آب اکسیژنه را به آب و اکسیژن تجزیه می کند H2o2 یکی از محصولات نهایی اکسیداسیون در متابولیسم کربوهیدرات ها می باشد .
- معرف کاتالاز : آب اکسیژنه ۳٪ !

کاتالاز

- روشهای انجام کاتالاز
- اسلایدی!

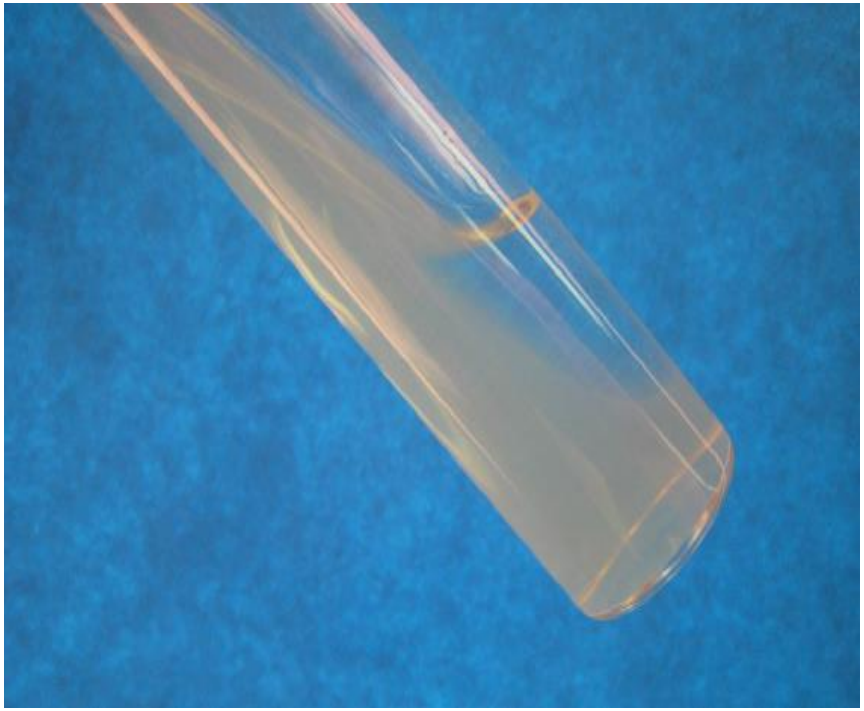


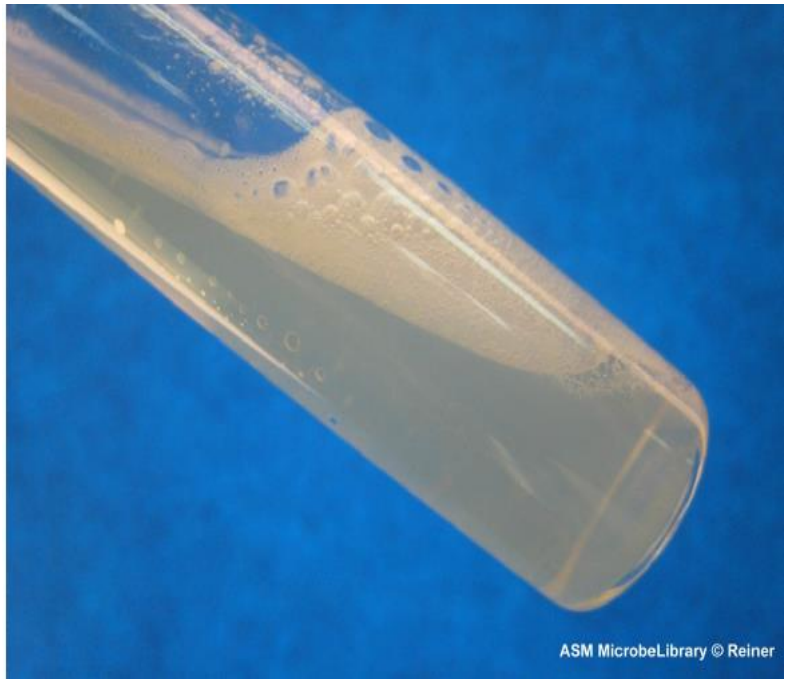
کاتالاز

روش لوله ای

کاتالاز

- روش لوله ای(اسلنت)





کاتالاز

- توصیه ها ومحدودیت ها:
- همیشه از دستکش عینک و روش‌های آسپتیک استفاده کنیم
- در صورت امکان آزمایش را در زیر هود انجام دهید
- واکنش های ضعیف را می توانیدبا استفاده از ذره بین بررسی نمایید
- روش اسلایدی را بهتر است در پتری دیش انجام دهید.(باکترهای پاتوژن)
- جهت تایید نتایج منفی یک لام را روی اسلاید گذاشته و با بزرگنمایی ۴۰ بررسی کنید نباید حباب ایجاد شود.
- از آگار خوندار با احتیاط استفاده کنید (شکلات آگار)
- ترجیحا از لوپهای فلزی استفاده نکنید

كاتالاز

- **Limitations:**
- Hydrogen peroxide is unstable and should undergo a control check daily prior to use.@
- Growth for catalase testing must be taken from an 18-24 hour culture. Organisms lose their catalase activity with age, resulting in a false-negative reaction.
- Catalase activity is a function of aerobic process. Organisms incubated anaerobically must be exposed to atmospheric oxygen for a minimum of 30 minutes before a catalase test is performed. Failure to complete this step may produce false-negative results.
- A positive catalase reaction with anaerobic organisms may be delayed for up to a minute after addition of the reagent.
- A weak catalase or pseudocatalase reaction may be produced by some strains of *Aerococcus* species and *Enterococcus* species.

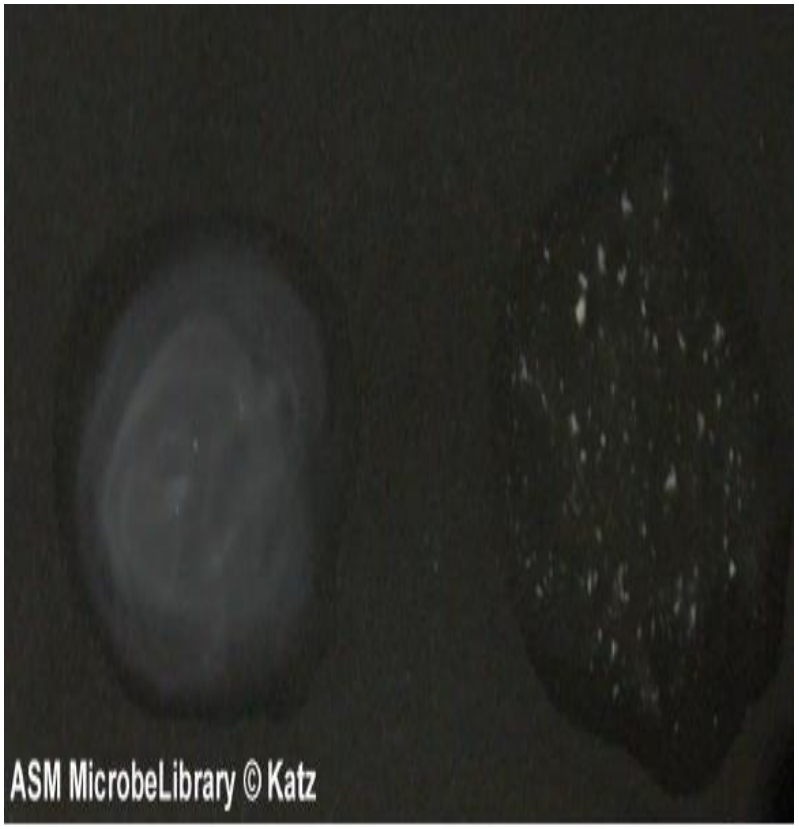
باکتری گزارش شده	تشخیص	تعداد تشخیص	درصد تشخیص
Streptococcus pyogenes (group A)	✔	237	%40.65
Streptococcus agalactiae (group B)		120	%20.58
Streptococcus pneumoniae		65	%11.15
Streptococcus spp. ,B-hemolytic Non group A or B		40	%6.86
Streptococcus spp.		35	%6
Streptococci , Viridans group		19	%3.26
Enterococcus spp.		15	%2.57
Staphylococcus epidermidis		11	%1.89
Staphylococcus spp.		9	%1.54
Streptococci , Alpha-hemolytic		9	%1.54
Streptococcus spp. ,B-hemolytic (group C)		7	%1.2
Enterococcus faecalis		6	%1.03
Staphylococcus aureus		4	%0.69
Staphylococcus saprophyticus		3	%0.51
Bacillus spp.		1	%0.17
Enterococcus faecium		1	%0.17
Proteus vulgaris		1	%0.17

	تعداد	درصد
تعداد نمونه های فرستاده شده :	669	
تعداد جواب های دریافتی :	611	%91.33
تعداد جواب های دارای تشخیص :	583	%95.42
تعداد جواب های بدون تشخیص :	28	%4.58
تعداد و درصد تشخیص های درست :	237	%40.65
تعداد و درصد تشخیص های نیمه درست :	167	%28.64
تعداد و درصد تشخیص های غلط :	179	٪30.7

کوآگولاز

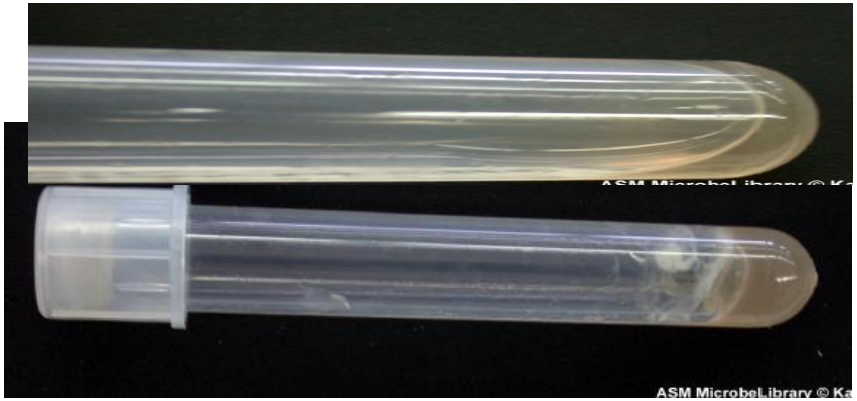
- تاریخچه:
- اولین گزارش در سال ۱۹۰۴ به وسیله Lobeانجام شد.وی متوجه شد که استافیلوکوک ها قادر به لخته کردن خون هستند(روش لوله ای).
- در فاصله کوتاهی بعد از آن در سال ۱۹۰۸ much متوجه شد که سلول‌های استافیلوکوکوس سریعا بعد از تماس با پلاسما تجمع پیدا می کنند(روش اسلایدی)
- پلاسمای حرارت دیده گرچه فعالیت خودش را در روش اسلایدی حفظ خواهد کرد اما در آزمایش لوله ای لخته نمی شود؟؟
- کواگولاز متصل که کلامپینگ فاکتور نامیده می شود پروتئین متصل به سلول است. این پروتئین روی فیبرینوژن تاثیر گذاشته و موجب تجمع سلول های باکتریایی می گردد.
- کواگولازآزاد(استافیلوکوآگولاز) پروتئین مترشحه از باکتری است . گرچه از نظر بیوشیمیایی مانند ترومبین نیست اما شبیه آن عمل می کند(به وسیله هپارین غیر فعال نمیشود). فیبرینوژن توسط کمپلکس استافیلوکوآگولاز- پروترومبین به فیبرین تبدیل می شود که در نهایت موجب تولید لحظه می گردد.
-

کوآگولاز



- روش اسلایدی:
- پلاسمایEDTA
- کشت میکروبی تازه(۱۸ تا ۲۴ ساعت)
- از باکتری مورد نظر سوسپانسیون میکروبی یکنواخت تهیه کرده@, یک قطره از آن را با یک قطره پلاسمای EDTA بر روی یک اسلاید میکروسکوپی تمیز مخلوط نمایید.
- اگر کواگولاز باند وجود داشته باشد, به واسطه فیبرینوژن موجود در پلاسما, سلول های باکتری تجمع پیدا می کنند.

کوآگولاز



- روش لوله ای:
- در یک لوله شیشه ای نیم میلی لیتر پلاسمای EDTAریخته و با استفاده از کلنی باکتری مورد نظر یک سوسپانسیون شیری (کدورت لوله۳ مک فارلند)تهیه نمایید.
- در حین رشد باکتری در پلاسما کواگولاز آزاد شده و با اتصال به پروترومبین آن را فعال کرده و موجب تبدیل فیبرینوژن به فیبرین و تشکیل لخته می گردد. جهت دستیابی به نتیجه مثبت ممکن است تا ۲۴ ساعت زمان لازم باشد.

کوآگولاز

Sl. No	Species	Tube Coagulase Test	Slide Coagulase Test
1	*Staphylococcus aureus*	+	+
2	*Staphylococcus schleiferi*	+	-
3	*Staphylococcus lugdunesis*	-	(+)
4	*Staphylococcus delphini*	+	-
5	*Staphylococcus intermedius*	+	d
6	*Staphylococcus hyicus*	d	-
7	*Staphylococcus epidermidis*	-	-
8	*Staphylococcus saprophyticus*	-	-

کوآگولاز

- **نکات عملی** :
- در هر دو روش باید از کشت تازی باکتری(۱۸ تا ۲۴ ساعته) استفاده نمود
- باکتری را باید از روی محیط هایی که ممانعت کننده نداشته باشند مانند بلاد آگار, شکلات آگارو تریپتیکیس سوی آگار برداشت نمود.
- مانیتول سالت آگار و فنیل اتیل الکل آگار و محیط های حاوی آنتی بیوتیک دارای ممانعت کننده بوده و مناسب نیستند.
- در روش لوله ای بعد از چهار ساعت لوله ها بررسی شوند در صورت منفی شدن تست لوله ها را باید به مدت ۲۴ ساعت انکوبه نمود.
- تشکیل لخته های ریز تا لحظه کامل که با وارونه شدن هم جدا نشود مثبت تلقی می گردد.
- هنگام کار با پلاسمای تجاری باید به اساس دستورالعمل سازنده آن توجه نمود.
- پلاسمای تجاری بعد از آماده سازی به مدت یک هفته در ۴ درجه سانتیگراد و در صورت تقسیم کردن در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک ماه پایدار است.
-
-

کوآگولاز

- **Limitations:**
- **The slide test should be read very quickly, as false positives can occur.**
- **Auto agglutination may occur.**
- **Use water instead of saline for mixing.**
- **The slide test should not be performed with organisms taken from high-salt media such as Mannitol Salt Agar, as the salt content can create false positives.**
- **Over mixing may cause the clot to break down.**
- **The tube test is more reliable than the slide test.**
- **generally don't use the coagulase test when identifying unknowns.**
- **Samples must be observed for clotting within 24 hours. This is because some strains that produce coagulase also produce an enzyme called fibrinolysin, which can dissolve the clot. Therefore, the absence of a clot after 24 hours is no guarantee that a clot never formed. The formation of a clot by 12 hours and the subsequent disappearance of the clot by 24 hours could produce a so-called false negative if the test were only observed at the 24-hour time.**

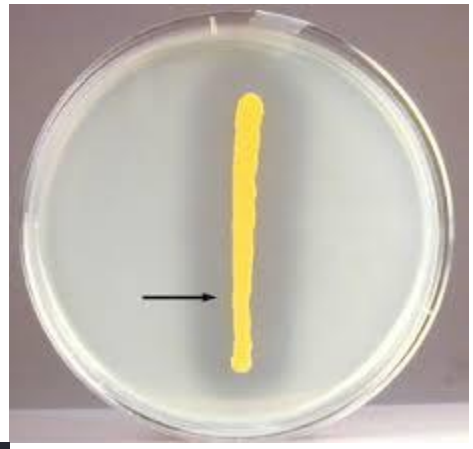
Not all S.*aureus* strains produce coagulase; such rare strains are identified by thermonuclease test.

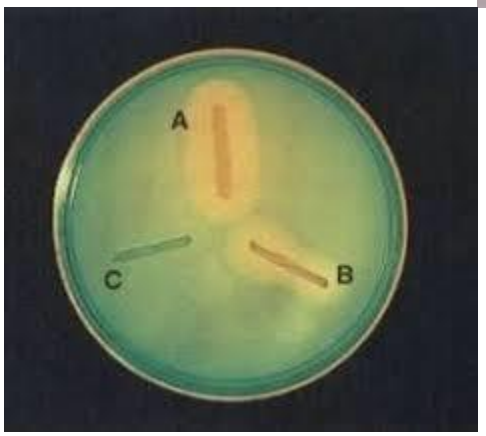
DNase Test

- هدف: این آزمایش جهت بررسی توانایی ارگانیسم ها در تولید دزوکسی ریبونوکلئاز است . همچنین جهت افتراق سراشیا از انتروباکتر و استافیلوکوکوس اورئوس از سایر گونه های استافیلوکوک و موراکسلا کاتارالیس از نایسریا ها مورد استفاده قرار میگیرد.
- اساس
- اساس این آزمایش در توانایی ارگانیسم برای هیدرولیز نوکلئیک اسید می باشد محیط مورد استفاده سبز کمرنگ است زیرا حاوی کمپلکس متیل گرین- DNA می باشد اگر ارگانیسمی که روی محیط کشت داده شده قادر به هیدرولیز DNA باشد رنگ سبز ناپدید شده و اطراف کلونی توسط یک هاله بی رنگ احاطه می گردد

DNase Test

- روش
- ارگانیسم را روی محیط DNase Agar به صورت خطی کشت دهید
- پلیت را در شرایط هوازی به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در حرارت ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید
- نتایج:
- مثبت: وقتی که DNA هیدرولیز می شود متیل گرین آزاد می‌شود واصراف کلنی راه ها له بیرنگ فرامی‌گیرد
- محدودیت ها
- بایستی از سوسپانسیون کشت جوان باکتری در براث(٤ ساعته) جهت تلقیح به محیط کشت استفاده نمود
- یا از کشت جوان باکتری(۱۸ تا ۲۴ ساعته) در یک تا دو میلی لیتر سالین استفاده نمود
- کنترل کیفی
- کنترل مثبت استافیلوکوک اورئوس
- کنترل منفیّ استافیلوکوک اپیدرمیدیس




A
B
C

S. aureus
Enterobacter
Serratia marcescens

DNase Test

- **Limitations**
- 1N HCL is bactericidal. Hence if the HCL has been applied the test must be read within 5 minutes.
- Methyl green medium is better for gram negative rods that first grow on the medium and then demonstrate a positive test.
- **Some MRSA strain do not give positive result**
- some strain of coagulase negative Staphylococci such as *Staphylococcus capitis* give weak positive reaction.
- For *Moraxella* and Gram-positive cocci with TBO testing, a low inoculum can result in a false-negative test, since these organisms may not grow well on the medium.

مانیتول سالت آگار

- هدف از انجام این آزمایش افتراق استافیلوکوک اورئوس از سایر اعضای خانواده میکروکوکاسیه است
- اساس آزمایش:
- غلظت بالای نمک (۷/۵%)رشد اکثر سوش های گرم منفی و گرم مثبت به جز استافیلوکوک را مهار میکند. استافیلوکوک می تواند مانیتول را تخمیر کند و اسید تولید کند. مانیتول (۱%)تنها کربوهیدرات موجود در محیط است .این مسئله منجر به کاهش PHمحیط و تغییر رنگ معرف فنل رد به زرد می شود
- در این آزمایش کلنی های استافیلوکوک اورئوس زرد شده و توسط هاله زردی احاطه می‌شود. اما سایر استافیلوکوک ها و میکرو کوکا سه که قدرت تخمیر مانیتول را ندارند با شکست پپتون موجود در محیط کلنی های قرمز رنگ با هاله ارغوانی قرمز ایجاد میکنند.
- کلنی های مورد نظر را روی محیط تلقیح کرده به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد در مجاورت هوای محیط انکوبه نمایید و سپس نتیجه را بررسی کنید.
- از آنجا که بعضی از گونه های استافیلوکوک مانیتول را آهسته تر تخمیر می کنند بنابراین لازم است حتما تا ۴۸ ساعت پلیت ها نگهداری شوند.
-

مانیتول سالت آگار

- محدودیت ها:
- انتروکوک می‌تواند روی این محیط رشد کرده و مانیتول را به میزان کمی تخمیر کند افتراق آنها از استافیلوکوک بر اساس رنگ آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز خواهد بود
- اگر مدت انکوباسیون طولانی تر از ۴۸ ساعت شود ارگانیسم های دیگری نیز که قدرت رشد و تخمیر مانیتول را دارندممکن است موجب تغییر رنگ محیط شوند.
- تمام کلنی های مشکوک به استافیلوکوک باید به کمک تست کواگولاز یا سایر تست های اختصاصی تایید شوند
- کنترل کیفی
- کنترل مثبت: استافیلوکوک اورئوس
- کنترل منفی استافیلوکوک اپیدرمیدیس

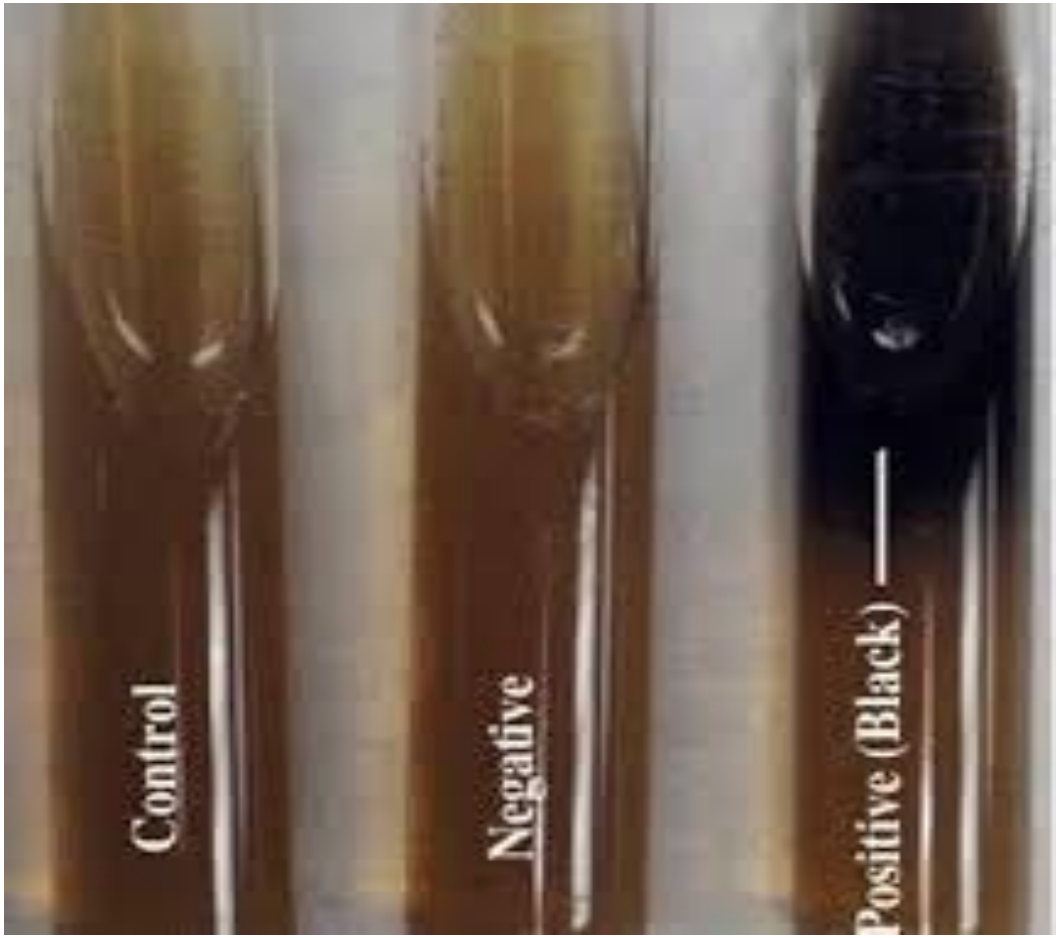
مانیتول سالت آگار

- **Limitations of Mannitol Salt Agar**
- Several *Staphylococcus* species other than *aureus* are mannitol positive and produce yellow colonies surrounded by yellow zones on this medium (e.g. *S. capitis, S. xylosus, S. cohnii, S. sciuri,*
- *S. simulans*, and other species). Therefore, further biochemical tests are necessary for the identification of S. aureus or other species.
- Most organisms other than staphylococci are inhibited by the high salt concentration found in Mannitol Salt Agar except for some halophillic marine organisms.
- A few strains of *Staphylococcus aureus* may exhibit a delayed fermentation of mannitol. Negative plates should be re-incubated overnight before discarding.
- Presumptive *Staphylococcus aureus* must be confirmed with a coagulase test.

هیدرولیز اسکولین

- اساس: این آزمایش جهت بررسی توانایی یک ارگانیسم در هیدرولیز اسکولین (گلوکوزید به عنوان منبع کربن) به اسکولیتین توسط آنزیم گلوکوزیداز انجام میشود.
- اسکولیتین با یون آهن FE+3 واکنش داده و رسوب قهوه ای تیره تا سیاه در محیط ایجاد میشود
- روش:
- مقداری از کلنی جوان باکتری را روی محیط کشت اسکرین برد و در ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می نماییم(تا هفت روز بررسی می کنیم)
- محیط کشت را جهت بررسی رسوب سیاه رنگ یا قهوه ای تیره مورد بررسی قرار می دهیم
- با استفاده از لامپ یا چراغ وود هیدرولیزاسکولین را بررسی نمایید
- نتایج:
- مثبت: سیاه شدن محیط که در زیر نور چراغ وود با کاهش فلورسانس محیط همراه است
- منفی عدم تغییر رنگ و عدم کاهش فلورسانس
- محدودیت ها:
- محیط اسکولین یک آگار غیر انتخابی است و آزمایش هیدرولیز بایل اسکولین یک روش انتخابی افتراقی است
- کنترل مثبت انتروکوکوس فکالیس
- کنترل منفی: اشریشیا کلای

هیدرولیز اسکولین



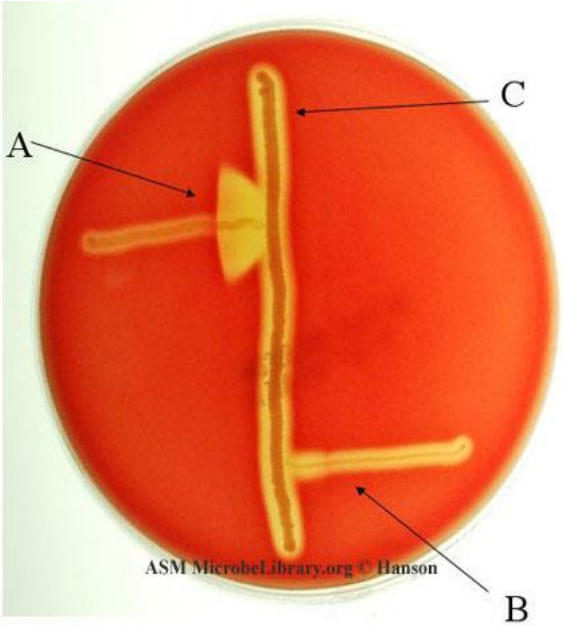
هيدروليز اسكولين

- **Limitation**
- Some micro-organisms such as *Escherichia coli* have a β-glucosidase and will react in this test after prolonged incubation.
- Prolonged incubation should not be used if the test is being used to detect only constitutive β-glucosidase.
- H2S which is produced by several organisms during metabolism, also reacts with iron to produce black complex which interferes with the interpretation of the esculin hydrolysis test.
- If the inoculum is too great or the concentration of bile is less than 40%, viridans group streptococci other than S.bovis can give a positive reaction on bile-esculin agar.
- Aheavy inoculum on BEA may cause interpretation of the bile esculin test difficult to read.
- Excess inoculum
  decreases the ability of the bile to inhibit growth of other gram-positive organisms that may hydrolyze esculin.

CAMP

- آزمایش کمپ
- اساس آزمایش کمپ پدیده لیتیک بین استافیلوکوکوس اورئوس واستریپتوکوکوس آگالاکتیه(گروهB) می باشد.این واکنش اولین بار در هنگام شیوع مخملک در بررسی کشت نمونه های شیرگاوها مشاهده شد.این همولیز تشدید شده درنتیجه تولید یک ماده مقاوم به حرارت است که توسط استریپتوکوکوس آگالاکتیه ایجاد می شود.استریپتوکوک های غیرگروهBقادر به نشان دادن اثر همولیز تشدید شده در زمانی که در کنار کلنی های استافیلوکوک های همولیتیک رشد کنند نیستند.
- این پدیده توسط پترسون برای شناسایی استریپتوکوکوس آگالاکتیه مورد استفاده قرار گرفت .مورای در سال ۱۹۵۲نام کمپ CAMP Testرابر اساس نام محققینی که روی این روش کار کرده بودندانتخاب کردChristi,Atkins,Munch,Petersen
- مورای استریپتوکوک رابه صورت یک خط عمود بر کشت استافیلوکوکوس اورئوس بتا همولیتیک کشت داد
- آزمایش کمپ روش سریع(کمتر از ۱۸ ساعت)و قابل اطمینان جهت شناسایی استریپتوکوک های گروهb در نمونه های بالینی است

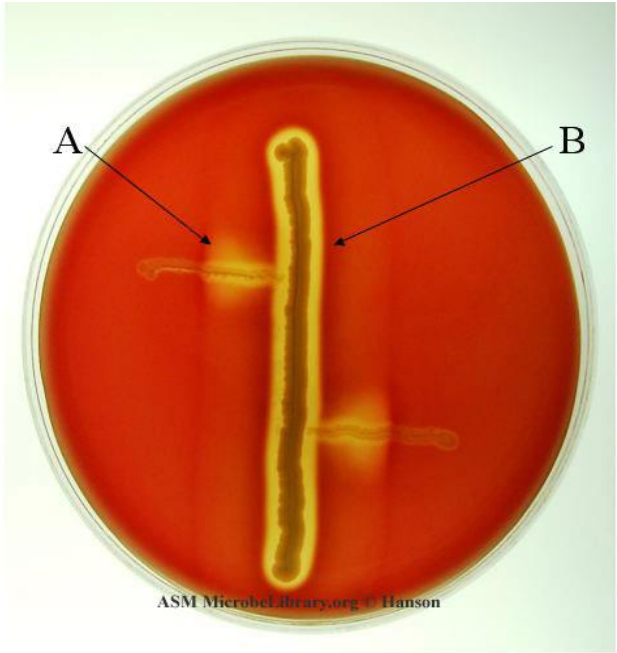
CAMP



- روش:
- استافیلوکوکوس اورئوس را به صورت طولی در مرکز یک پلیت آگار خوندار کشت میدهیم
- سوش استافیلوکوکوس اورئوس مورد استفاده بایستی قادر به تولید مقادیر زیادی بتا توکسین باشد .باکتری مورد نظر استرپتوکوک گروه(B)را به صورت عمود برکشت استافیلوکوک اورئوس به صورت خطی کشت می دهیم فاصله کشت خطی این دو باکتری از هم باید ۱ تا ۲ میلیمتر باشد پلیت را در ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت هوای محیط انکوبه می کنیم تا از نتایج مثبت کاذب کاسته شود(دمای محیط ویژگی آزمایش را افزایش میدهد)
- نتیجه مثبت: به صورت همولیز تشدید شده به صورت پیکان قابل مشاهده است
- نتیجه منفی: منطقه همولیز قابل مشاهده نیست

CAMP test for the identification of *Listeria monocytogenes*

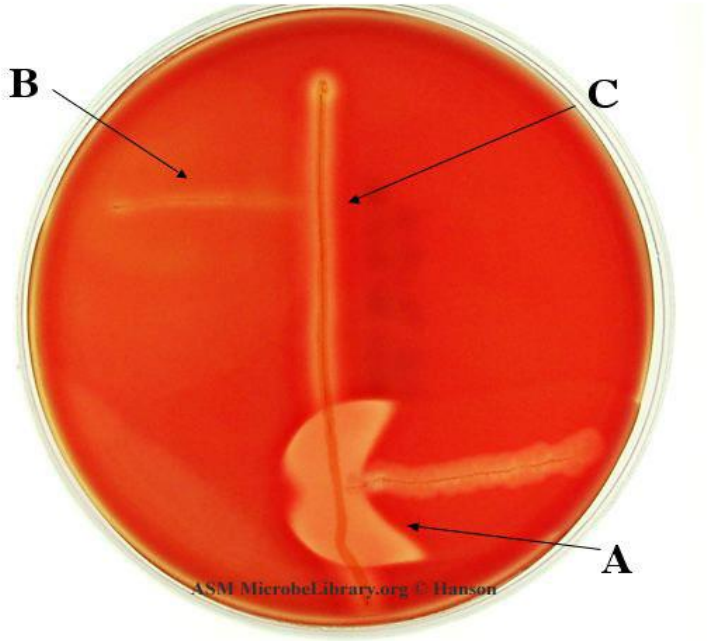
.



CAMP test for the identification of *Listeria monocytogenes*. (A) *Listeria monocytogenes* shows a positive CAMP reaction when streaked at a right angle to (B) *Staphylococcus aureus*

Reverse CAMP Test

.



The reverse CAMP test for the identification of *Clostridium perfringens*. (A) Reverse CAMP-positive *Clostridium perfringens* and (B) reverse CAMP-negative *Clostridium septicum* streaked at right angles to (C) *Streptococcus agalactiae* (group B).

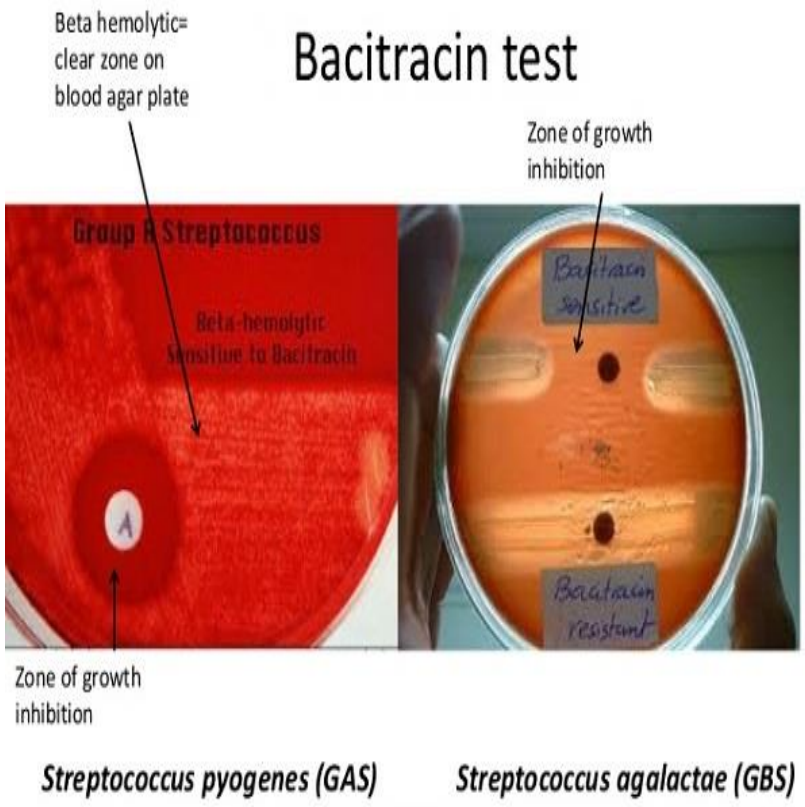
CAMP

- **Limitation of CAMP test**
- A small percentage of group A streptococci may have a positive CAMP reaction.
- Some Group A Streptococcal will be CAMP test positive if the plate is incubated in a candle jar in an atmosphere or under anaerobic conditions. Therefore, ambient air incubation should be done.
- The test should be limited to colonies with the characteristic group B streptococci morphology and narrow zone beta-hemolysis on sheep blood agar.
- Extended incubation times or elevated incubation temperatures may give false-positive results.
- Sheep blood agar plates are only used. Human, horse, rabbit, or guinea pig blood plates will not give a proper reaction.
- Colonies of *Listeria monocytogenes* have a narrow zone of beta-hemolysis on sheep blood agar and may be confused with group B beta-hemolytic streptococci, if catalase and gram stain are not performed.

آزمایش حساسیت به باسیتراسین

- باسیتراسین توسط باسیلوس لیکنی فورمیس تولید شده و در تشکیل پپتیدوگلیکان دیواره سلولی اختلال ایجاد میکند
- اگر باسیتراسین در محیط کشت وجود داشته باشد در تشکیل باکتوپرنول به واسطه انتقالNAG و NAM در دیواره سلولی و تشکیل پپتیدوگلیکان دیواره سلولی اختلال بوجود می آورد
- اساس:
- این آزمایش جهت تشخیص استرپتوکوک های گروه A از سایر استرپتوکوک های بتا همولیتیک کاربرد دارد .در آزمایش حساسیت به باسیتراسین اثر مقادیر کم باسیتراسین (چهار صدم واحد) بر روی ارگانیسم بررسی می شود. معمولاً استرپتوکوکوس پیوژنز به این مقادیر کم باسیتراسین حساس وسایر استرپتوکوک ها مقاومند.

آزمایش حساسیت به باسیتراسین



- نتایج:
- مثبت(حساس): هر زون مهارکنندگی بیشتر از ۱۰م م درطراف دیسک باسیتراسین۶م م(استرپتوکوکوس پیوژنز)
- منفی:(مقاوم): عدم ایجادهاله مهارکنندگی اطراف دیسک یا کمتر از ۱۰ م م (استرپتوکوکوس آگالاکتیه)
- کنترل کیفی:
- استرپتوکوکوس پیوژنز
- ATCC 19015
- استرپتوکوکوس آگالاکتیه ATCC13813

آزمایش حساسیت به باسیتراسین

- **Limitation**
- An old dried out blood agar plate should not be used because it reduces diffusion of the bacitracin giving a false-negative result.
- Due to differences in zone size resulting from different concentrations of bacitracin, differential disk (0.04 units) in comparison to sensitivity disks (10unites), are used in the test.
- When testing isolates, a light inoculum may result in false zone of inhibition. So it is important that an inoculum resulting in confluent growth be used.
- It is recommended that biochemical and/or serological tests such as latex agglutination can be performed on colonies from pure culture for complete identification

PYR Test

- جهت بررسی فعالیت آنزیم پیرونیدونیل آمینوپپتیداز در استرپتوکوکوس پیوژنز، انتروکوک و برخی از استافیلوکوک های کواگولاز منفی و انتروباکتریاسه ها کاربرد دارد.
- ۹۸٪ استرپتوکوک های گروه A، انتروکوک های گروه D قادر به هیدرولیز PYR هستند. آئروکوکها که ندرتا از نمونه های بالینی ایزوله می شوند استثنائاً قادر به هیدرولیزPYR هستند.
- اساس:
- روشی سریع جهت شناسایی احتمالی باکتری ها بر اساس وجود آنزیم پیرونیدونیل آمینوپپتیداز است در این روشPYR(ال-پیرونیدونیل -بتا-نفتیل آمید) به عنوان سوبستراي آنزیم مورد استفاده قرار گرفته و محصول نهایی نفتیل آمید در حضور معرف متیل سینام آلدئید رسوب قرمز روشن در لوله واکنش ایجاد میکند.
- روش براث
- ابتدا ۳ تا ۵ کلونی خالص باکتری را در محیط PYRبراث کشت داده و در شرایط هوازی به مدت چهار ساعت در ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید
- دو تا قطره معرف متیل سینام آلدئید را به لوله اضافه کرده و تغییر رنگ را مشاهده کنید.
- در طی یک تا دو دقیقه رنگ ایجاد شده را بررسی کنید.

PYR Test

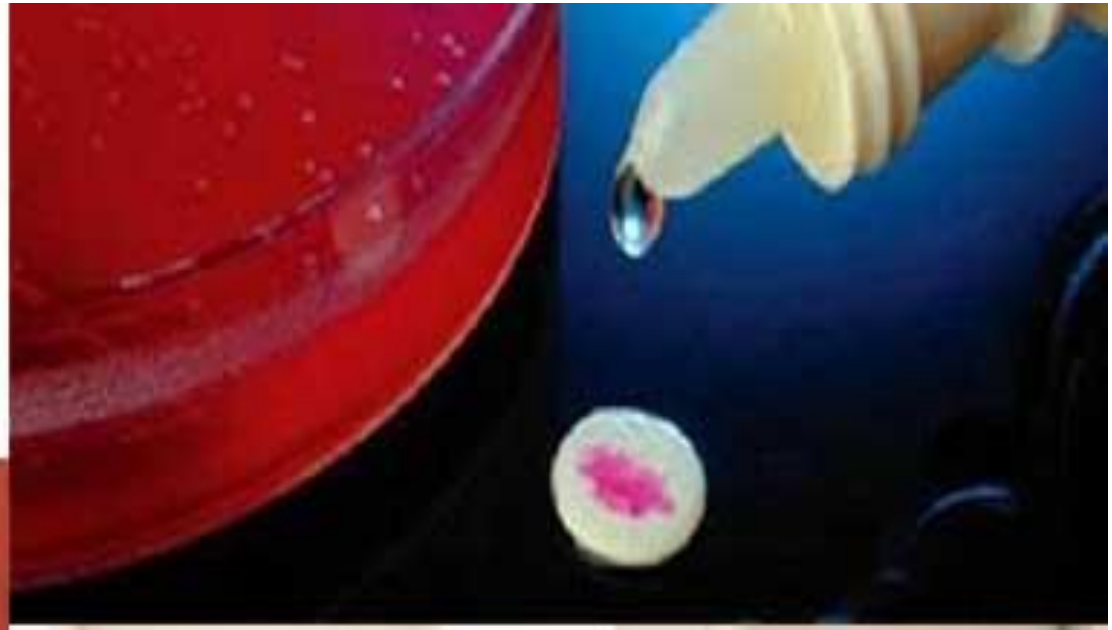
- روش دیسک(سریع)
- با استفاده از ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه دیسک PYR را مرطوب نمایید.
- با استفاده از آنس تعداد ۳ تا ۵ کلونی را روی سطح دیسک بگسترانید
- بعد از دو دقیقه یک قطره معرف PYR اضافه نموده و در طی یک تا دو دقیقه رنگ واکنش را بررسی نمایید.
- نتیجه مثبت رنگ قرمز آلبالویی در طی یک تا دو دقیقه
- نتیجه منفی عدم تغییر رنگ یا ایجاد رنگ آبی کمرنگ(به دلیل واکنش مثبت ایندول)
- کنترل کیفی
- کنترل مثبت: انتروکوکوس فکالیس ATCC29212

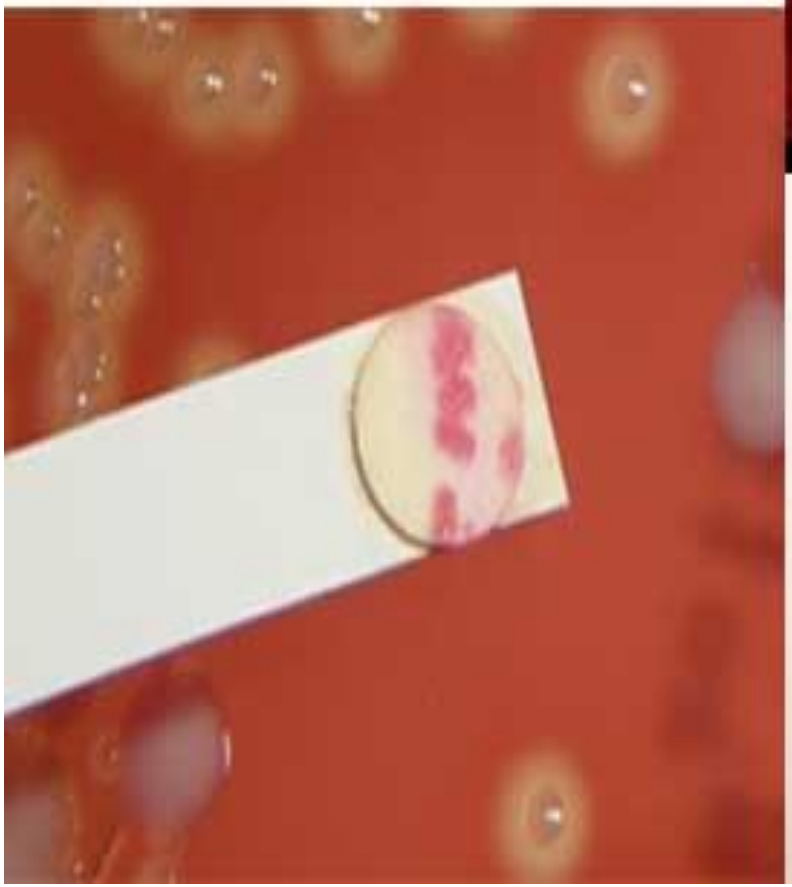
  کنترل منفی: استرپتوکوکوس آگالاکتیه ATCC10386

PYR Test

- محدودیت ها
- استفاده از کشت خالص شدیدا توصیه می شود
- نتیجه منفی کاذب ممکن است در نتیجه ی مرطوب بودن بیش از حد دیسک ایجاد شود.
- اگر باکتری از محیط های انتخابی یا افتراقی برداشته شود نتیجه منفی کاذب ایجاد خواهد شد
- اشرشیاکلی و پروتئوس اندول مثبت هستند. اگر از محیط هایی که حاوی غلظت های بالای تریپتوفان هستند برداشت شود ممکن ا ست رنگ سبز متمایل به آبی ایجاد نمایند که منفی در نظر گرفته می شود
- برخی از لاکتو کوکسی ها و آئروکوکسی هاممکن است نتیجه مثبت داشته باشند
- اگر نتیجه آزمایش بعد از ۲ دقیقه قرائت شود رنگ های غیر اختصاصی ممکن است دیده شود که مورد توجه نبایستی قرار گیرند.

PYR Test





آزمایش هیدرولیز هیپورات سدیم

- هدف از انجام این تست توانایی تولید آنزیم هیپوریکاز و هیدرولیز هیپورات سدیم توسط باکتری است
- اساس
- محصول نهایی در هیدرولیز هیپوریک اسید,گلایسین و بنزوئیک اسید است وجود گلایسین را نین هیدرین مشخص میکند که در این پروسه احیا می شود و ایجاد رنگ ارغوانی می کند محیط بایستی فقط حاوی هیپورات باشد زیرا نین هیدرین ممکن است با اسیدهای آمینه آزاد موجود در محیط کشت واکنش دهد .همچنین این تست برای شناسایی گاردنلا واژینالیس لیستریا مونوسیتوژنز کمپیلوباکتر ژژونی و استرپتوکوک گروه ب به کار می رود

آزمایش هیدرولیز هیپورات سدیم

- *محدودیت ها:*
- *این* تست برای تمایز استرپتوکوک های بتا همولیتیک مورد استفاده قرار میگیرد
- رنگ ارغوانی بسیار کمرنگ به معنی نتیجه منفی
- تست می‌تواند در باسیلوس، کورینه باکتریوم و انتروباکتریاسه ها هم مثبت شود
- محلول هیپورات سدیم تا هفت روز در ۴ درجه سانتیگراد پایدار است
- محلول نین هیدرین را میتوان تا ۶ ماه نگهداری نمود
-

باتشکر از توجه شما